

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591029

研究課題名（和文）常染色体劣性遺伝多発性嚢胞腎遺伝子の細胞内情報伝達における役割の研究

研究課題名（英文）the research of PKHD1 product FPC in cell signaling related to major ARPKD phenotypes.

研究代表者

貝森 淳哉（KAIMORI JUNYA）

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：70527697

研究成果の概要（和文）：常染色体劣性遺伝多発性嚢胞腎は小児の病気で、生後すぐに腎嚢胞による腎不全、高血圧、肝臓の線維化を主症状とする。本研究は、この遺伝子から出来るタンパク質が、様々なたんぱく質を消去する役割を制御していることを発見した。そのため、遺伝子異常が起これば、本来、消えるはずのタンパク質が過剰に残ってしまうために、結果的に腎嚢胞、高血圧、肝臓の線維化が起こってくると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) suffers patients in childhood. The disease phenotypes are polycystic kidney, hypertension and hepatic fibrosis. This research project discovers ARPKD gene, PKHD1 product, FPC regulates ubiquitin proteasome pathway. The mutated FPC or PKHD1 inactivation lead to a halt of degradation of important proteins in cell structure, sodium absorption and TGF-beta signaling, causing ARPKD disease phenotypes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：遺伝子・発現制御・腎臓・細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

常染色体劣性遺伝多発性嚢胞腎は当時丁度、原因遺伝子 PKHD1 が発見されていたが、この遺伝子異常が何故、この疾患を引き起こすのか不明な点が多かった。特に、常染色体優性

遺伝では、顕著に表れない、本態性高血圧、肝臓線維化の分子病理学的メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

腎嚢胞形成、本態性高血圧症、肝臓線維化といった常染色体劣性遺伝多発性嚢胞腎の疾患メカニズムを明らかにするため、この遺伝子産物の細胞内シグナル伝達を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

PKHD1 del3-4/del3-4 mouse 及び pck Rat を用いて研究を行った。また、human PKHD1 stable MDCK, HEK293 cell line, mouse IMCD pkhd1 kd cell line を用いて、in vitro の解析を行った。

4. 研究成果

- (1) PKHD1 stable MDCK cell line は細胞密度が低い時は、細胞の長けの低い平坦な細胞塊を示しているが、細胞密度が高くなると細胞の長けが高くなるという、細胞密度によるダイナミックな形態の変化を示した。Rho GTPase family 蛋白が細胞骨格形成に重要な働きをしている事はよく知られている。そこで我々は、Rho GTPase family 蛋白である RhoA, CDC42, Rac1 の細胞内のタンパク発現量を調べてみたところ、RhoA の蛋白量が PKHD1 stable MDCK cell line で control に比べて低下している事を発見した。そこで、今度は mouse IMCD pkhd1 kd cell line を調べてみたところ、反対に今度は RhoA の蛋白量が control に比べて低下していた。
- (2) RhoA の蛋白量は smurf1 という ubiquitin proteasome E3 ligase によってコントロールされていることが知られている。我々は、PKHD1 stable HEK293 cell line を用いて免疫沈降実

験を行ったところ、PKHD1 のタンパク産物 FPC が smurf1 と complex を作っていることを発見した。また、smurf1 の isoform である smurf2 も FPC と同じく complex を作っており、smurf2 の target である、rap1B も RhoA と同様の変化をしていた。すなわち、PKHD1 の発現を knock out するか knock down するかすれば、RhoA 及び Rap1B の発現は上昇し、PKHD1 を過剰発現すれば RhoA 及び Rap1B の発現は減少した。

- (3) FPC が smurf1, 2 と細胞内で complex を作り、ubiquitin proteasome E3 ligase の働きを制御している事が判明したので、smurf1, 2 の細胞内局在を観察したところ、FPC は細胞内で vesicle の形で smurf1, 2 と共存していることが判明した。次に、FPC が働かない細胞及び組織では smurf1 は主に核に局在していることが確認された。Smurf2 は、FPC が働かない細胞及び組織では、細胞内の大きな vacuole の中にトラップされている事が確認された。細胞内の vesicle traffic が異常を起こすと大きな vacuole が細胞内に形成されることが知られており、この事からも FPCsmurf1, 2 が付いた vesicle trafficking に関わっていることが推察される。
- (4) RhoA は細胞内で F-actin の制御を行っていることが知られている。そこで、FPC が働かない細胞及び組織で F-actin formation を調べたところ、腎臓内嚢胞及び肝臓内嚢胞を取り巻く細胞で F-actin formation が著しく阻害されていることが判明した。また、Rap1B は、細胞間で cell-cell junction 形成に重

要な働きをしている E cadherin trafficking に関わっている事が知られている。そこで、FPC が働かない細胞及び組織で E-cadherin を調べたところ、腎臓内嚢胞及び肝臓内嚢胞を取り巻く細胞で E-cadherin の細胞間への輸送が著しく阻害されていることが判明した。これらの事から FPC が働かない組織では RhoA 及び Rap1B の制御が上手くいかず、細胞の構造が異常をきたしていることが明らかとなった。

- (5) smurf2 は TGF- β ligand の bound した TGF- β 受容体を ubiquitin proteasome 系で消去することによって、TGF- β のシグナル伝達を負に制御していることが知られている。TGF- β シグナル伝達系は組織線維化において重要な働きをしていることは有名である。そこで、pck Rat より樹立した胆管上皮細胞で TGF- β 受容体を調べたところ、normal rat 由来の細胞に比べて、TGF- β 受容体消去が阻害されており、当然のことながら、TGF- β 情報伝達が亢進している事が判明した。また、smurf2 は lipid raft vesicle で TGF- β 受容体消去を行っているが、FPC が働かない細胞では、lipid raft vesicle がほとんど機能していないだけでなく、TGF- β の刺激を核に伝える non-lipid raft vesicle の働きが亢進している事が判明した。
- (6) 高血圧症の原因にナトリウムの体内への蓄積が深くかかわっている事は有名である。smurf1,2 は NEDD4 family という、E3 ligase であり、その中には、集合管においてナトリウム再吸収を担っている、Enac の量を制御している、

NEDD4-2 がある。Enac も smurf1,2 と同様に FPC と complex を形成しているか共免疫沈降法によって調べたところ、smurf1,2 と同様の結果が得られた。また、pck rat の集合管において、NED4-2 が大きな vacuole に trap されている事が確認されたと共に、集合管の apical 側の細胞膜に 3 種類の Enac が強発現している事が確認された。また、pck rat から単離した集合管細胞ではナトリウム電流が亢進している事、Enac 阻害薬であるトリウムテレンが pck rat の高血圧を効果的に抑制できることも発見した。

- (7) 以上の事から、FPC が細胞内情報伝達において重要な働きをしている NEDD4 family である NEDD4-2, smurf1,2 と complex を作り、細胞内骨格、組織線維化、ナトリウム再吸収を制御している事が判明した。また、PKHD1 del13-4/del13-4 mouse 及び pck Rat では、NEDD4-2, smurf1,2 の細胞内局在が大きく変化している事、NEDD4-2, smurf1,2 の target である、RhoA, Rap1B, TGF-beta receptor, Enac が過剰に細胞内に残留してこれらのシグナル伝達が異常をきたしていることを発見した。これらの事から、常染色体劣性遺伝多発性嚢胞腎の嚢胞形成、高血圧、肝臓線維化を説明出来る可能性がある。これらの発見は、劣性遺伝多発性嚢胞腎の治療につながる可能性がある。現在、これらすべての研究成果をまとめて論文に投稿中である。
- (8) PKHD1 del13-4/del13-4 mouse 及び pck Rat では大きな vacuole が発生して、vesicle trafficking が著しく阻害されている事が判明した。そこで、最近注目されてい

る autophagy と PKD との関連について、現在、尿細管特異的、autophagy ko mouse と PKHD1 del3-4/del3-4 mouse を掛け合わせる事によって解析している。実験は現在、進行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 貝森淳哉 *Pkhd1* deficiency identifies a novel functional relationship between FPC, Nedd4 ubiquitin ligase family-mediated endocytosis, TGF-beta signaling, and ENaC regulation. 米国腎臓学会 2010 年 11 月 18 日 米国 Denver
- ② 小尾義嗣 ARPKD の主要臨床症状 (腎嚢胞形成、肝線維化、高血圧症) が HECT ubiquitin E3 ligase family を介した vesicle trafficking の異常という概念で統一的に説明出来る可能性 分子腎臓フォーラム2010 2010年9月4日 東京
- ③ 貝森淳哉 *Pkhd1* deficiency identifies a novel functional relationship between Fibrocystin/Polyductin and NEDD4 family E3 ligase mediated endocytosis, leading to ARPKD clinical symptoms. 腎疾患と高血圧研究会 2010 年 7 月 3 日 東京
- ④ 貝森淳哉 *Pkhd1* deficiency causes dysregulation in SMURFs and endocytosis, leading to

cell-structural changes and enhanced TGF-beta signaling 日本腎臓学会
2010 年 6 月 16 日 神戸

- ⑤ 貝森淳哉 Polyductin(PD1) deficiency causes dysregulation of Smurfs and altered endocytosis, resulting in cytostructural changes and TGF-b signaling defects. 日本腎臓学会
2009 年 6 月 4 日 パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

貝森 淳哉 (KAIMORI JUNYA)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号 : 70527697

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :